



MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

D. G. P. I. - UFFICIO CENTRALE BREVETTI

BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

1 248080

Il presente brevetto viene concesso per l'invenzione oggetto della domanda sotto specificata:

N. COMANDA	Anno	Cod. Prov.	U.P.I.C.A.	CODICI	DATA PRES. COMANDA									
					S	M	A	H	M	P				
2098188		15	MILANO	11326	15	06	88	00	00	00	00			

A64K

TITOLARE LEONARD MAITLAND MCEWEN
OXFORDSHIRE GRAN BRETAGNA

TITOLO COMPOSIZIONI CONTENENTI BETA
GLUCURONIDASI.

INV. DES. LEONARD MAITLAND MCEWEN

PRIORITA GRAN BRETAGNA DOM. BREV. N. 87
13906 DEL 15 GIUGNO 1987

12 APR. 1990

Roma, 11

IL DIRETTORE

Registro A

Protocollo n° 20961A/88



MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

Ufficio Provinciale Industria Commercio e Artigianato di Milano

COPIA DEL VERBALE DI DEPOSITO PER BREVETTO D'INVENZIONE INDUSTRIALE

L'anno 1988 il giorno quindici del mese di Giugno

~~Il Signor~~
Il Signor

Leonard Maitland McEWEN

di nazionalità inglese ~~xxxxxx~~ in Henley-On-Thames, Oxfordshire (Gran Bretagna)

a mezzo mandatarî: G. ZANARDO, R. GARAVAGLIA, S. ROGGERO, F. SINISCALCO, R. APPOLONI, E. DE CARLI, A. ZAPPELLA, R. COLETTI
ed elettivamente domiciliat agli effetti di legge a Milano - Via Borgonuovo, 10

presso Ing. BARZANO & ZANARDO MILANO S.p.A.

ha presentato a me sottoscritto:

- Domanda in bollo per la concessione di un BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

avente per

TITOLO:

"Composizioni contenenti beta-glucuronidasi"

Inventor e designato: Leonard Maitland McEWEN

Priorità della domanda di brevetto in: GRAN BRETAGNA N. 87 13906 del 15 Giugno 1987

corredata di:

- Descrizione in duplo di n. 17 pagine di scrittura.
 - ~~xxxxxx~~
 - Lettera d'incarico - ~~xxxxxx~~ (riserva)
 - Documento di priorità e traduzione italiana (riserva)
 - ~~xxxxxx~~
 - ~~xxxxxx~~
 - Attestazione di versamento sul c/c postale n. 00668004 intestato all'Ufficio del Registro tasse e concessioni di Roma di L. 187.000 emessa dall'Uff. Postale di Milano 57 il 31.5.88-8.6.88 n. 679-861
 - Marca da bollo da L. 5.000.-
- I mandatarî non sottoscrivono la dichiarazione di cui alla circolare N.149 non essendo in possesso di specifica autorizzazione.

La domanda, le descrizioni ed i disegni sopraelencati sono stati firmati dal richiedente e da me controfirmati e bollati col timbro d'ufficio

IL DEPOSITANTE

McEwen

L'UFFICIALE ROGANTE

Rag. Antonio Marinelli

p. Il Direttore
(Benito Boschetto)

Rag. Antonio Marinelli

Per copia conforme all'originale
«Si precisa che per tale domanda e allegati l'imposta di bollo è stata assolta conformemente alla circolare n° 163/83 dell'U.C.B. e succ. modif., con riserva di eventuali integrazioni che saranno





AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

UFFICIO CENTRALE BREVETTI - ROMA

sottoscritti
L. DINEK

Leonard Maitland McEWEN

di nazionalità inglese

domiciliat

~~DOXXSXX~~ HENLEY-ON-THAMES, Oxfordshire (Gran Bretagna)

rappresentat dai sottoscritti mandatarî della Ing. BARZANO & ZANARDO

MILANO S.p.A. con domicilio eletto in MILANO, Via Borgonuovo, 10, domanda

la concessione di un brevetto d'invenzione avente per titolo:

"Composizioni contenenti beta-glucuronidasi"

Inventore designato: Leonard Maitland McEWEN

PRIORITA': Si rivendica il diritto di priorità derivante dalla domanda di brevetto in GRAN BRETAGNA N. 67 13906 del 15 Giugno 1987

Documentazione allegata:

- a) Descrizione in duplice copia di n. 17 pagine di scrittura;
- b) ~~Doppia copia di n. 17 pagine di scrittura~~
- c) Lettera d'incarico; (riserva) ✓
- d) Documento/i di priorità con traduzione italiana; (riserva) ✓
- e) Atti di vers.to (sul C/C/P n. 668004) di L. 187.000 emesse dall'Uff. Post. di Milano; f) Marca da bollo da L. 5000 ~~g) ~~XXXXXX~~~~

p.p. Leonard Maitland McEWEN

Milano, 15 Giugno 1988

MANDATARI NOMINATI:

G. Zanardo - R. Garavaglia - S. Roggero - R. Appoloni,
F. Siniscalco - E. De Carli - A. Zappulla - R. Coletti

(firma) *Sal. Siniscalco*
(per sé e per gli altri)

U.P.C.A. MILANO
SERVIZIO BREVETTI
15.06.88 020981
Orc. min.

20981A/88



SJW/6138

Ing. Barzanò & Zanardo

DESCRIZIONE

dell'invenzione industriale del titolo:

"Composizioni contenenti beta-glucuronidasi"

a nome: Leonard Maitland McEWEN

di nazionalità: inglese

residente in: MENLEY-ON-THAMES, Oxfordshire - Gran
Bretagna -

Inventore: Leonard Maitland McEWEN

depositata il 15 GIU. 1988

N° 209814/88

RIASSUNTO

Composizioni contenenti l'enzima β -glucuronidasi sono utili per il trattamento di certe infezioni virali croniche per esempio Sindrome da Immunodeficienza Acquisita e Encefalopatia Mialgica. Preferibilmente, le composizioni comprendono una soluzione acquosa sterile di β -glucuronidasi, 1,3-cicloesano diolo e protamina.

DESCRIZIONE

La presente invenzione riguarda composizioni contenenti beta-glucuronidasi. Più in particolare, essa riguarda composizioni di beta-glucuronidasi per l'impiego nel trattamento di certe infezioni virali croniche per esempio Sindrome da Immunodeficienza Acquisita e quelle comunemente denominate, in generale, come sindrome post-virale.

Viene descritto che la sindrome post-virale (altrimenti nota come Encefalopatia Mialgica) viene provocata principalmente da una infezione cronica con virus Cocksackie (con termine classico Cocksackie B4), oppure con virus Epstein Barr. Risulta che altri casi sono provocati da una infezione cronica con virus non identificati. Pazienti che presentano una sindrome post-virale spesso presentano sintomi di intolleranza per il cibo. Pazienti infettati con Virus da Immunodeficienza Umana (HIV) nelle ultime fasi dello stadio "carrier", presentano un cattivo stato di salute cronico, che spesso comporta complicazioni intestinali e complicazioni cutanee.

La presente invenzione è basata sulla scoperta che il trattamento di pazienti che presentano tali infezioni virali croniche effettuato usando certe composizioni che contengono beta-glucuronidasi può realizzare un miglioramento dei sintomi di tali infezioni.

E' noto che la beta-glucuronidasi ha la possibilità di potenziare l'effetto desensibilizzante di basse dosi di allergeni, per esempio estratto di polline, nell'uomo e può venire usata per il trattamento profilattico di febbre da fieno nell'uomo, vedi L.M. McEwen e altri, "Ann. Allerg.", 31, (1973),

p 543-550. Gli autori, in questo riferimento bibliografico, hanno descritto che l'effetto immunologico della beta-glucuronidasi viene controllato dalla presenza di una qualsiasi sostanza che contenga almeno due gruppi ossidrilici, in particolare 1,3-dioli. L. M. McEwen e altri, in "Ann. Allerg.", 34, (1975), p 290-295, hanno descritto che l'attività immunologica della beta-glucuronidasi viene anch'essa influenzata dalla presenza di protamina in modo che composizioni di beta-glucuronidasi/1,3-cicloesan diolo contenenti protamina richiedono concentrazioni minori del diolo, in confronto a composizioni che non contengono protamina, per ottenere il medesimo effetto immunologico. Il trattamento di pazienti che presentano un'acuta allergia per il cibo con iposensibilizzazione potenziata da enzimi usando formulazioni contenenti beta-glucuronidasi, 1,3-cicloesan diolo e protamina è descritto da p 98-103.

Secondo un primo aspetto, la presente invenzione mette a disposizione l'uso di beta-glucuronidasi per la produzione di una composizione per l'impiego nel trattamento di sindrome post-virale, detta composizione comprendendo una soluzione acquosa sterile di beta-glucuronidasi altamente pu-

rificata.

Secondo un secondo aspetto, la presente invenzione mette a disposizione l'uso di beta-glucuronidasi per la produzione di una composizione per l'impiego nel trattamento della Sindrome da Immuno-deficienza Acquisita, detta composizione comprendendo una soluzione acquosa sterile di beta-glucuronidasi altamente purificata.

Tipicamente, secondo gli aspetti descritti sopra, la concentrazione di beta-glucuronidasi nella soluzione di trattamento sarà compresa tra 50 e 1000 unità di Fishman, preferibilmente sarà di circa 400 unità Fishman, per dose somministrata al paziente.

In una forma di realizzazione preferita, le composizioni utili per il trattamento di pazienti che soffrono della sindrome post-virale oppure che presentano infezioni HIV, conterranno inoltre un composto contenente almeno due gruppi ossidrilici per il controllo dell'attività immunologica della beta-glucuronidasi. Tali composti che, naturalmente, saranno non tossici per il corpo umano nelle concentrazioni adottate, tipicamente saranno quelli aventi almeno due gruppi ossidrilici situati su atomi di carbonio adiacenti oppure separati da

fino a 4 atomi di carbonio. Sostanze diverse, come per esempio mucopolisaccaridi, glucosio e glicol propilenico hanno la possibilità di controllare l'attività immunologica della beta-glucuronidasi. Tuttavia, si preferiscono gli 1,3-dioli poichè essi sono capaci di influire sull'attività dell'enzima in concentrazioni molto minori. Tra gli 1,3-dioli utili nella presente invenzione, si possono ottenere buoni risultati usando il 1,3-cicloesano diolo in una concentrazione compresa tra 3×10^{-10} e 1×10^{-11} g per dose somministrata al paziente. Così, in una tipica dose di 0,1 ml iniettata per via intradermica in un paziente, la concentrazione di cui sopra corrisponde a una concentrazione effettiva compresa tra 3×10^{-9} e 1×10^{-10} g/ml.

Si può anche controllare l'attività immunologica ed enzimatica di una beta-glucuronidasi purificata facendo variare le concentrazioni di certe diammine (per esempio il 1,10-diamminodecano) e di certe poliammine. Tuttavia, nella presente invenzione, si preferisce utilizzare l'attività di composti contenenti gruppi ossidrilici, come è descritto sopra, assicurando un effetto di poliammina ampio e prevedibile mediante l'aggiunta di protamina. Nel caso di composizioni contenenti protamina come

agente attivante oltre al potenziatore 1,3-diolo e oltre alla beta-glucuronidasi, la dose ottimale del diolo è inferiore rispetto al caso nel quale non si usa protamina. Nelle composizioni descritte sopra, preferibilmente si aggiunge la protamina ad una concentrazione tipica compresa tra 1×10^{-8} e 1000×10^{-8} g per dose somministrata al paziente.

E' notevolmente preferito, nella presente invenzione, trattare pazienti affetti da sindrome post-virale o da infezione HIV con caratteristiche che suggeriscono una ipersensibilità, usando formulazioni che contengono beta-glucuronidasi, 1,3-cicloesano diolo e protamina. Così, una particolare forma di realizzazione preferita della presente invenzione mette a disposizione l'impiego di una composizione che comprende beta-glucuronidasi, 1,3-cicloesano diolo e protamina per la realizzazione di una preparazione da impiegare nel trattamento di una sindrome post-virale o nel trattamento di una sindrome da immunodeficienza acquisita, nella quale la preparazione comprende una soluzione-tampone priva di fosfato, acquosa, sterile, contenente da 50 a 1000 unità Fishman di beta-glucuronidasi, da 1×10^{-10} fino a 3×10^{-9} g di 1,3-cicloesano diolo e da 1×10^{-8} fino a 1×10^{-5} g di pro-

tamina, tutte le concentrazioni essendo per dose da somministrare al paziente.

Nella preparazione di cui sopra, la sostanza-tampone usata è una sostanza-tampone priva di fosfato, preferibilmente una sostanza-tampone acetato di sodio/HCl avente un pH di circa 6,9 per assicurare una stabilità ottimale degli ingredienti della preparazione. La preparazione di cui sopra può venire somministrata a pazienti con oppure senza allergeni o estratti di allergeni. Estratti di allergeni, come quelli che vengono usati nel noto trattamento di allergie con desensibilizzazione potenziata da enzimi, possono anche venire incorporati nei preparati di trattamento descritti sopra, se si desidera, allo scopo di effettuare la desensibilizzazione nel paziente. Estratti di allergeni, quando vengono usati, saranno presenti in concentrazioni estremamente basse varianti da 1×10^{-6} g per dose fino a circa 1×10^{-14} g per dose, a seconda di quale allergene viene impiegato e a seconda di quale sindrome allergica viene trattata. Nel caso di allergeni purificati di peso molecolare noto (per esempio additivi per cibi) si possono adottare dosaggi contenenti piccole quantità per esempio circa 100 molecole, per ottenere buoni effetti.

La produzione e la conservazione di tali preparati a diluizioni elevate richiede l'uso di molecole di supporto e, per questo scopo, è molto adatto il 6-solfato di condroitina. Tuttavia, si possono usare altre sostanze, per esempio eparina, invece del supporto di allergene. Il solfato di condroitina, introdotto in una formulazione somministrata ad un paziente ha l'effetto di alterare l'attivazione di quella formulazione e, pertanto, influisce sulle dosi ottimali di protamina e di diolo. Tipicamente, se si usa il solfato di condroitina, esso sarà presente in una quantità compresa tra 1 e 0,01 mg per dose.

Si è trovato che formulazioni come quelle descritte sopra, quando vengono somministrate a pazienti con sindrome post-virale che presentano sintomi di intolleranza per il cibo, provocano un maggior miglioramento globale nei sintomi, che persiste per parecchie settimane. Quando l'effetto scompare, non è possibile ripristinare il paziente fino al medesimo grado di benessere evitando i cibi verso i quali il paziente dimostra intolleranza. Così, si ritiene che la formulazione di beta-glucuronidasi conferisca un maggiore beneficio extra che è indipendente dagli allergeni del cibo con il quale

essa viene somministrata. In questo ruolo, la formulazione di beta-glucuronidasi migliora direttamente i sintomi della sindrome post-virale ma non stimola il sistema immunitario del paziente in modo da liberarlo dalla persistente infezione virale. Risulta evidente che la tolleranza viene provocata, per alcuni aspetti, dall'effetto dell'infezione virale cronica.

Sebbene l'effetto più importante di questo trattamento di tolleranza dipenda dagli antigeni aggiunti alla formulazione (l'antigene virale presente all'interno del corpo del paziente è sufficiente), i pazienti adatti per questo trattamento, spesso, richiederanno, contemporaneamente, una desensibilizzazione provocata da enzimi nei confronti di antigeni del cibo.

Oltre a quanto indicato sopra, si è scoperto che se è presente cicloesano diolo in ciascuna dose della formulazione di beta-glucuronidasi somministrata al paziente ad una concentrazione compresa tra 1×10^{-8} e 1×10^{-7} g e se questa formulazione viene somministrata con una opportuna dose di antigene, si ottiene come effetto una ipersensibilizzazione; l'inverso della immunotolleranza. Questa scoperta forma la base di un aspetto separato della

presente invenzione che mette a disposizione l'uso di una composizione che comprende beta-glucuronidasi, 1,3-cicloesano diolo e protamina per la produzione di una formulazione per fare aumentare la risposta immune cellulare nell'uomo verso vaccini immunizzanti, in cui la formulazione comprende una soluzione-tampone priva di fosfato, acquosa, sterile, contenente da 50 a 1000 unità Fishman di beta-glucuronidasi, da 1×10^{-8} fino a 1×10^{-7} g di 1,3-cicloesano diolo, da 1×10^{-8} fino a 1×10^{-5} g di protamina e una adatta dose di antigene, tutte le concentrazioni essendo espresse per dose somministrata al paziente. Inoltre, si è scoperto che se si somministra la suddetta formulazione enzima/diolo/protamina (senza antigene) a pazienti che sono affetti da infezioni virali croniche a lunga durata, il trattamento stimola l'immunità dei pazienti provocando la risoluzione dell'infezione cronica. Si osserva questo effetto in pazienti che presentano una sindrome post-virale e in altre infezioni virali croniche per esempio prostatite cronica provocata da virus e herpes ricorrente.

Inoltre, si è ora scoperto che si possono anche trattare pazienti infettati con HIV nei modi descritti sopra. Si possono migliorare gli ultimi

stadi dello stato carrier come da sindrome post-virale Coxsackie B4. Per questo scopo, si dovrà usare una formulazione desensibilizzante che contiene beta-glucuronidasi e 1,3-cicloesan diolo, con oppure senza allergeni. Quando è opportuno, si può collegare questo trattamento ad una terapia alimentare, ad una terapia anti-candida e a misure atte ad evitare allergeni. Come alternativa, si può migliorare qualsiasi fase dell'infezione HIV mediante somministrazione al paziente di una formulazione ipersensibilizzante di beta-glucuronidasi e di 1,3-cicloesan diolo.

ESEMPIO 1

Formulazioni adatte per il trattamento di un paziente con sindrome post-virale o infezione HIV, con caratteristiche che suggeriscono una ipersensibilità

Beta-glucuronidasi, 400 unità Fishman

1,3 cicloesan diolo, 3×10^{-10} g

Protamina 2×10^{-6} g

Antigeni 1×10^{-10} fino a 1×10^{-14} g (facoltativi)

Solfato di condroitina 0,1 mg

Iniezione per via intradermica in 0,2 ml di soluzione tampone acetato di sodio/HCl, pH 6,9.

ESEMPIO 2

Formulazioni adatte per fare aumentare la risposta
immune cellulare verso vaccini immunizzanti

Beta-glucuronidasi, 400 unità Fishman

1,3 cicloesano diolo, 3×10^{-8} g

Protamina 2×10^{-6} g

Una adatta dose di antigene

Iniezione per via intradermica in 0,2 ml di
soluzione tampone acetato di sodio/HCl, pH 6,9.

ESEMPIO 3

Formulazioni adatte per il trattamento di uno stato
"carrier" virale

Beta-glucuronidasi, 400 unità Fishman

1,3 cicloesano diolo, 3×10^{-8} g

Protamina 2×10^{-6} g

Iniezione per via intradermica in 0,4 ml di solu-
zione-tampone acetato di sodio/HCl, pH 6,9.

ESEMPIO 4

Trattamento di un paziente infettato dal Virus da
Immunodeficienza Umana

Il paziente è un uomo di 32 anni. Probabile
data dell'infezione: da 4 anni. Condizioni di sa-
lute non buone, non specifiche negli ultimi 10 mesi.
Diagnosi effettuata un anno prima del trattamento
con beta-glucuronidasi. Effettuati 3 trattamenti
secondo la formulazione dell'esempio 3 mediante

iniezioni intradermiche.

Le conte dei linfociti e le date del trattamento erano le seguenti:

(Valori normali di laboratorio)		1500-4000	815-2480	280-1350)
Data	Trattamento	Totale Linfociti	T4 (Protettore)	T8 (Soppressore)
23 Luglio	-	3306	661	2248
4 Agosto	Dose 1			
25 Agosto	-	3876	271	3458
17 Settembre	-	2989	209	2152
23 Settembre	Dose 2			
27 Ottobre	Dose 3			
3 Dicembre		5049	1009	3839

Interpretazione:

Il paziente aveva già numeri aumentati di linfociti T8. La prima dose di beta-glucuronidasi attivata ha stimolato le cellule T8, in particolare quelle aventi una funzione distruttiva. Le cellule del sottogruppo T4 che erano già infettate dal virus (e pertanto non funzionali) sono state eliminate.

Un ulteriore trattamento stimola la riproduzione

zione dei sottogruppi T4 e T8 con recupero dei numeri T4.

In Settembre, il paziente, che aveva riguadagnato il suo benessere, è stato colpito da un attacco di influenza dal quale esso si è ripreso rapidamente senza effettuare alcun trattamento oppure senza che si avesse alcuna complicazione. E' possibile che le cellule T8 siano state influenzate dalla beta-glucuronidasi in modo da adottare certe funzioni protettive.

La conta di linfociti T8 aumentati prima del trattamento è tipica di una contemporanea infezione da citomegalovirus (CMV). In corrispondenza della conclusione del trattamento, il test CMV - IgM era negativo. In corrispondenza di questo stadio, le elevate conte di linfociti T8 si manifestavano come risposte ai trattamenti con beta-glucuronidasi effettuati da soli.

RIVENDICAZIONI

1. Composizione per l'impiego nel trattamento di infezioni virali croniche nell'uomo che comprende beta-glucuronidasi, come ingrediente attivo, in un mezzo acquoso sterile.

2. Composizione secondo la rivendicazione 1 per l'impiego nell'alterare la risposta immune in

uomini che soffrono di encefalopatia mialgica oppure infetti da virus da immunodeficienza umana.

3. Composizione secondo la rivendicazione 1 oppure secondo la rivendicazione 2, nella quale la concentrazione di beta-glucuronidasi nel mezzo acquoso sterile è compresa tra 50 e 1000 unità Fishman per dose da somministrare ad un paziente.

4. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3 che comprende inoltre un diolo oppure un poliolo che contiene almeno due gruppi ossidrilici che sono situati su atomi di carbonio adiacenti o separati da fino a 4 atomi di carbonio nella molecola per controllare l'attività immunologica della beta-glucuronidasi.

5. Composizione secondo la rivendicazione 4, nella quale il diolo è 1,3-cicloesano diolo.

6. Composizione secondo la rivendicazione 5, nella quale il 1,3-cicloesano diolo è presente ad una concentrazione compresa tra 3×10^{-10} e 1×10^{-11} g per dose da somministrare ad un paziente.

7. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6, nella quale la composizione comprende inoltre un composto di una diammina oppure un composto di una poliammina.

8. Composizione secondo la rivendicazione 7,

nella quale il composto di una poliammina è protamina.

9. Composizione secondo la rivendicazione 8, nella quale la protamina è presente ad una concentrazione compresa tra 1×10^{-8} e 1000×10^{-8} g per dose da somministrare ad un paziente.

10. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9 che comprende inoltre una sostanza-tampone priva di fosfato.

11. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 10 che comprende inoltre una minore quantità di un allergene oppure di un suo estratto.

12. Composizione secondo la rivendicazione 11, che comprende inoltre 6-solfato di condroitina come sostanza-veicolo per l'allergene oppure per l'estratto di allergene.

13. Composizione per l'impiego nel fare aumentare la risposta immune cellulare nell'uomo che comprende una soluzione-tampone priva di fosfato, acquosa, sterile di 50 fino a 1000 unità Fishman di beta-glucuronidasi, 1×10^{-8} fino a 1×10^{-7} g di 1,3-cicloesano diolo, 1×10^{-8} fino a 1×10^{-5} g di protamina e una adatta dose di un antigene, tutte le concentrazioni essendo espresse per dose da som-

ministrare ad un paziente.

14. Una composizione per stimolare la risposta immune in uomini che soffrono di infezioni virali croniche che comprende una soluzione-tampone priva di fosfato, acquosa, sterile di 50 fino a 1000 unità Fishman di beta-glucuronidasi, 1×10^{-8} fino a 1×10^{-7} g di 1,3-cicloesano diolo e 1×10^{-8} fino a 1×10^{-5} g di protamina, tutte le concentrazioni essendo per dose da somministrare ad un paziente.

I MANDATARI:

(firma)

Stala: R. Zanardo
(per sé e per gli altri)





MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

D. G. P. I. — UFFICIO CENTRALE BREVETTI

BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

1 218080

Il presente brevetto viene concesso per l'invenzione oggetto della domanda sotto specificata:

N. DOMANDA	Anno	Cod. Prov.	U.P.I.C.A.	CODICI	DATA PRES. DOMANDA					
					B	M	A	E	M	P
2098180		15	MILANO	11326	15	06	88	00	00	00

A64K

TITOLARE LEONARD MAITLAND MCEWEN
OXFORDSHIRE GRAN BRETAGNA

TITOLO COMPOSIZIONI CONTENENTI BETA
GLUCURONIDASI.

INV. DES. LEONARD MAITLAND MCEWEN

PRIORITA GRAN BRETAGNA DOM. BREV. N. 87
13906 DEL 15 GIUGNO 1987

12 APR. 1990

IL DIRETTORE

Roma, il

Registro A

Protocollo n° 20981/A/88



MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

Ufficio Provinciale Industria Commercio e Artigianato di Milano

COPIA DEL VERBALE DI DEPOSITO PER BREVETTO D'INVENZIONE INDUSTRIALE

L'anno 1988 il giorno quindici del mese di Giugno

~~Il Signor~~ Leonard Maitland McEWEN

di nazionalità inglese ~~xxxxxx~~ in Henley-On-Thames, Oxfordshire (Gran Bretagna)

a mezzo mandatarî: G. ZANARDO, R. GARAVAGLIA, S. ROGERO, F. SINISCALCO, R. APPOLONI, E. DE CARLI, A. ZAPPELLA, R. COLETTI
ed elettivamente domiciliat agli effetti di legge a Milano - Via Borgonuovo, 10

presso Ing. BARZANO & ZANARDO MILANO S.p.A.

ha presentato a me sottoscritto:

- Domanda in bollo per la concessione di un BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

avente per

TITOLO:

"Composizioni contenenti beta-glucuronidasi"

Inventor e designato: Leonard Maitland McEWEN

Priorità della domanda di brevetto in: GRAN BRETAGNA N. 87 13906 del 15 Giugno 1987

corredata di:

- Descrizione in duplo di n. 17 pagine di scrittura.

- ~~Disegni, n. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17~~

- Lettera d'incarico - ~~Documentazione, n. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17~~ (riserva)

- Documento di priorità e traduzione italiana (riserva)

- ~~Attestazione di versamento sul c/c postale n. 00668004 intestato all'Ufficio del Registro tasse e concessioni di Roma di L. 187.000 emessa dall'Uff. Postale di Milano 57 il 31.5.88-B.6.88 n. 679-361~~

- ~~Attestazione di versamento sul c/c postale n. 00668004 intestato all'Ufficio del Registro tasse e concessioni di Roma di L. 187.000 emessa dall'Uff. Postale di Milano 57 il 31.5.88-B.6.88 n. 679-361~~

- Attestazione di versamento sul c/c postale n. 00668004 intestato all'Ufficio del Registro tasse e concessioni di Roma di L. 187.000 emessa dall'Uff. Postale di Milano 57 il 31.5.88-B.6.88 n. 679-361

- Marca da bollo da L. 5.000.-

I mandatarî non sottoscrivono la dichiarazione di cui alla circolare N.149 non essendo in possesso di specifica autorizzazione.

La domanda, le descrizioni ed i disegni soprastenuti sono stati firmati dal richiedente e da me controfirmati e bollati col timbro d'ufficio

IL DEPOSITANTE

McEwen

L'UFFICIALE ROGANTE

Reg. *Antonio Martinelli*

P. Il Direttore
(Benito Boschetto)

Reg. *Antonio Martinelli*

Per copia conforme all'originale

«Si precisa che per tale domanda è allegati l'imposta di bollo è stata assolta conformemente alla circolare n° 163/83 dell'U.C.B. e succ. modif., con riserva di eventuali integrazioni che saranno





AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

UFFICIO CENTRALE BREVETTI - ROMA

Sottoscritti
LA Ditta

Leonard Maitland McEWEN

di nazionalità inglese

Domiciliat

~~con sede~~ a HENLEY-ON-THAMES, Oxfordshire (Gran Bretagna)

rappresentat dal sottoscritti mandatarî della Ing. BARZANO & ZANARDO

MILANO S.p.A. con domicilio eletto in MILANO, Via Borgonuovo, 10, domanda

la concessione di un brevetto d'Invenzione avente per titolo:

"Composizioni contenenti beta-glucuronidasi"

Inventore designato: Leonard Maitland McEWEN

PRIORITA': Si rivendica il diritto di priorità derivante dalla domanda di brevetto in GRAN BRETAGNA N. 87 13906 del 15 Giugno 1987

Documentazione allegata:

- a) Descrizione in duplice copia di n. 17 pagine di scrittura;
- b) ~~Disegni in duplice copia~~
- c) Lettera d'incarico; (riserva) ✓
- d) Documento/i di priorità con traduzione italiana; (riserva) ✓
- e) Att.ni di vers.to (sul C/C/P n. 668004) di L. 187.000 emesse dall'Uff. Post. di Milano; f) Marca da bollo da L. 5000 ~~xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx~~

p.p. Leonard Maitland McEWEN

Milano, 15 Giugno 1988

MANDATARI NOMINATI:

G. Zorardo - R. Gravaglia - S. Roggero - R. Appoloni,

F. Siniscalco - E. De Carli - A. Zappella - R. Coletti

(firma) *Sal. Siniscalco*

(per sè e per gli altri)

U.R.I.C.A. MILANO
SERVIZIO BREVETTI
15.06.88 020981
Ore _____ min _____

20981A/88



SJW/6138

Ing. Barzanò & Zanardo

DESCRIZIONE

dell'invenzione industriale dal titolo:

"Composizioni contenenti beta-glucuronidasi"

a nome: Leonard Maitland McEWEN

di nazionalità: inglese

residente in: HENLEY-ON-THAMES, Oxfordshire - Gran

Bretagna -

Inventore: Leonard Maitland McEWEN

depositata il 15 GIU. 1988

N° 209814/88

RIASSUNTO

Composizioni contenenti l'enzima β -glucuronidasi sono utili per il trattamento di certe infezioni virali croniche per esempio Sindrome da Immunodeficienza Acquisita e Encefalopatia Mialgica. Preferibilmente, le composizioni comprendono una soluzione acquosa sterile di β -glucuronidasi, 1,3-cicloesano diolo e protamina.

DESCRIZIONE

La presente invenzione riguarda composizioni contenenti beta-glucuronidasi. Più in particolare, essa riguarda composizioni di beta-glucuronidasi per l'impiego nel trattamento di certe infezioni virali croniche per esempio Sindrome da Immunodeficienza Acquisita e quelle comunemente denominate, in generale, come sindrome post-virale.

Viene descritto che la sindrome post-virale (altrimenti nota come Encefalopatia Mialgica) viene provocata principalmente da una infezione cronica con virus Coxsackie (con termine classico Coxsackie B4), oppure con virus Epstein Barr. Risulta che altri casi sono provocati da una infezione cronica con virus non identificati. Pazienti che presentano una sindrome post-virale spesso presentano sintomi di intolleranza per il cibo. Pazienti infettati con Virus da Immunodeficienza Umana (HIV) nelle ultime fasi dello stadio "carrier", presentano un cattivo stato di salute cronico, che spesso comporta complicazioni intestinali e complicazioni cutanee.

La presente invenzione è basata sulla scoperta che il trattamento di pazienti che presentano tali infezioni virali croniche effettuato usando certe composizioni che contengono beta-glucuronidasi può realizzare un miglioramento dei sintomi di tali infezioni.

E' noto che la beta-glucuronidasi ha la possibilità di potenziare l'effetto desensibilizzante di basse dosi di allergeni, per esempio estratto di polline, nell'uomo e può venire usata per il trattamento profilattico di febbre da fieno nell'uomo, vedi L.M. McEwen e altri, "Ann. Allerg.", 31, (1973),

p 543-550. Gli autori, in questo riferimento bibliografico, hanno descritto che l'effetto immunologico della beta-glucuronidasi viene controllato dalla presenza di una qualsiasi sostanza che contenga almeno due gruppi ossidrilici, in particolare 1,3-dioli. L. M. McKwen e altri, in "Ann. Allerg.", 34, (1975), p 290-295, hanno descritto che l'attività immunologica della beta-glucuronidasi viene anch'essa influenzata dalla presenza di protamina in modo che composizioni di beta-glucuronidasi/1,3-cicloesan diolo contenenti protamina richiedono concentrazioni minori del diolo, in confronto a composizioni che non contengono protamina, per ottenere il medesimo effetto immunologico. Il trattamento di pazienti che presentano un'acuta allergia per il cibo con iposensibilizzazione potenziata da enzimi usando formulazioni contenenti beta-glucuronidasi, 1,3-cicloesan diolo e protamina è descritto da p 98-103.

Secondo un primo aspetto, la presente invenzione mette a disposizione l'uso di beta-glucuronidasi per la produzione di una composizione per l'impiego nel trattamento di sindrome post-virale, detta composizione comprendendo una soluzione acquosa sterile di beta-glucuronidasi altamente pu-

rificata.

Secondo un secondo aspetto, la presente invenzione mette a disposizione l'uso di beta-glucuronidasi per la produzione di una composizione per l'impiego nel trattamento della Sindrome da Immuno-deficienza Acquisita, detta composizione comprendendo una soluzione acquosa sterile di beta-glucuronidasi altamente purificata.

Tipicamente, secondo gli aspetti descritti sopra, la concentrazione di beta-glucuronidasi nella soluzione di trattamento sarà compresa tra 50 e 1000 unità di Fishman, preferibilmente sarà di circa 400 unità Fishman, per dose somministrata al paziente.

In una forma di realizzazione preferita, le composizioni utili per il trattamento di pazienti che soffrono della sindrome post-virale oppure che presentano infezioni HIV, conterranno inoltre un composto contenente almeno due gruppi ossidrilici per il controllo dell'attività immunologica della beta-glucuronidasi. Tali composti che, naturalmente, saranno non tossici per il corpo umano nelle concentrazioni adottate, tipicamente saranno quelli aventi almeno due gruppi ossidrilici situati su atomi di carbonio adiacenti oppure separati da

fino a 4 atomi di carbonio. Sostanze diverse, come per esempio mucopolisaccaridi, glucosio e glicol propilenico hanno la possibilità di controllare l'attività immunologica della beta-glucuronidasi. Tuttavia, si preferiscono gli 1,3-dioli poichè essi sono capaci di influire sull'attività dell'enzima in concentrazioni molto minori. Tra gli 1,3-dioli utili nella presente invenzione, si possono ottenere buoni risultati usando il 1,3-cicloesano diolo in una concentrazione compresa tra 3×10^{-10} e 1×10^{-11} g per dose somministrata al paziente. Così, in una tipica dose di 0,1 ml iniettata per via intradermica in un paziente, la concentrazione di cui sopra corrisponde a una concentrazione effettiva compresa tra 3×10^{-9} e 1×10^{-10} g/ml.

Si può anche controllare l'attività immunologica ed enzimatica di una beta-glucuronidasi purificata facendo variare le concentrazioni di certe diammine (per esempio il 1,10-diamminodecano) e di certe poliammine. Tuttavia, nella presente invenzione, si preferisce utilizzare l'attività di composti contenenti gruppi ossidrilici, come è descritto sopra, assicurando un effetto di poliammina ampio e prevedibile mediante l'aggiunta di protamina. Nel caso di composizioni contenenti protamina come

agente attivante oltre al potenziatore 1,3-diolo e oltre alla beta-glucuronidasi, la dose ottimale del diolo è inferiore rispetto al caso nel quale non si usa protamina. Nelle composizioni descritte sopra, preferibilmente si aggiunge la protamina ad una concentrazione tipica compresa tra 1×10^{-8} e 1000×10^{-8} g per dose somministrata al paziente.

È notevolmente preferito, nella presente invenzione, trattare pazienti affetti da sindrome post-virale o da infezione HIV con caratteristiche che suggeriscono una ipersensibilità, usando formulazioni che contengono beta-glucuronidasi, 1,3-cicloesano diolo e protamina. Così, una particolare forma di realizzazione preferita della presente invenzione mette a disposizione l'impiego di una composizione che comprende beta-glucuronidasi, 1,3-cicloesano diolo e protamina per la realizzazione di una preparazione da impiegare nel trattamento di una sindrome post-virale o nel trattamento di una sindrome da immunodeficienza acquisita, nella quale la preparazione comprende una soluzione-tampone priva di fosfato, acquosa, sterile, contenente da 50 a 1000 unità Fishman di beta-glucuronidasi, da 1×10^{-10} fino a 3×10^{-9} g di 1,3-cicloesano diolo e da 1×10^{-8} fino a 1×10^{-5} g di pro-

tamina, tutte le concentrazioni essendo per dose da somministrare al paziente.

Nella preparazione di cui sopra, la sostanza-tampone usata è una sostanza-tampone priva di fosfato, preferibilmente una sostanza-tampone acetato di sodio/HCl avente un pH di circa 6,9 per assicurare una stabilità ottimale degli ingredienti della preparazione. La preparazione di cui sopra può venire somministrata a pazienti con oppure senza allergeni o estratti di allergeni. Estratti di allergeni, come quelli che vengono usati nel noto trattamento di allergie con desensibilizzazione potenziata da enzimi, possono anche venire incorporati nei preparati di trattamento descritti sopra, se si desidera, allo scopo di effettuare la desensibilizzazione nel paziente. Estratti di allergeni, quando vengono usati, saranno presenti in concentrazioni estremamente basse varianti da 1×10^{-6} g per dose fino a circa 1×10^{-14} g per dose, a seconda di quale allergene viene impiegato e a seconda di quale sindrome allergica viene trattata. Nel caso di allergeni purificati di peso molecolare noto (per esempio additivi per cibi) si possono adottare dosaggi contenenti piccole quantità per esempio circa 100 molecole, per ottenere buoni effetti.

La produzione e la conservazione di tali preparati a diluizioni elevate richiede l'uso di molecole di supporto e, per questo scopo, è molto adatto il 6-solfato di condroitina. Tuttavia, si possono usare altre sostanze, per esempio eparina, invece del supporto di allergene. Il solfato di condroitina, introdotto in una formulazione somministrata ad un paziente ha l'effetto di alterare l'attivazione di quella formulazione e, pertanto, influisce sulle dosi ottimali di protamina e di diolo. Tipicamente, se si usa il solfato di condroitina, esso sarà presente in una quantità compresa tra 1 e 0,01 mg per dose.

Si è trovato che formulazioni come quelle descritte sopra, quando vengono somministrate a pazienti con sindrome post-virale che presentano sintomi di intolleranza per il cibo, provocano un maggior miglioramento globale nei sintomi, che persiste per parecchie settimane. Quando l'effetto scompare, non è possibile ripristinare il paziente fino al medesimo grado di benessere evitando i cibi verso i quali il paziente dimostra intolleranza. Così, si ritiene che la formulazione di beta-glucuronidasi conferisca un maggiore beneficio extra che è indipendente dagli allergeni del cibo con il quale

essa viene somministrata. In questo ruolo, la formulazione di beta-glucuronidasi migliora direttamente i sintomi della sindrome post-virale ma non stimola il sistema immunitario del paziente in modo da liberarlo dalla persistente infezione virale. Risulta evidente che la tolleranza viene provocata, per alcuni aspetti, dall'effetto dell'infezione virale cronica.

Sebbene l'effetto più importante di questo trattamento di tolleranza dipenda dagli antigeni aggiunti alla formulazione (l'antigene virale presente all'interno del corpo del paziente è sufficiente), i pazienti adatti per questo trattamento, spesso, richiederanno, contemporaneamente, una desensibilizzazione provocata da enzimi nei confronti di antigeni del cibo.

Oltre a quanto indicato sopra, si è scoperto che se è presente cicloesano diolo in ciascuna dose della formulazione di beta-glucuronidasi somministrata al paziente ad una concentrazione compresa tra 1×10^{-8} e 1×10^{-7} g e se questa formulazione viene somministrata con una opportuna dose di antigene, si ottiene come effetto una ipersensibilizzazione; l'inverso della immunotolleranza. Questa scoperta forma la base di un aspetto separato della

presente invenzione che mette a disposizione l'uso di una composizione che comprende beta-glucuronidasi, 1,3-cicloesano diolo e protamina per la produzione di una formulazione per fare aumentare la risposta immune cellulare nell'uomo verso vaccini immunizzanti, in cui la formulazione comprende una soluzione-tampone priva di fosfato, acquosa, sterile, contenente da 50 a 1000 unità Fishman di beta-glucuronidasi, da 1×10^{-8} fino a 1×10^{-7} g di 1,3-cicloesano diolo, da 1×10^{-8} fino a 1×10^{-5} g di protamina e una adatta dose di antigene, tutte le concentrazioni essendo espresse per dose somministrata al paziente. Inoltre, si è scoperto che se si somministra la suddetta formulazione enzima/diolo/protamina (senza antigene) a pazienti che sono affetti da infezioni virali croniche a lunga durata, il trattamento stimola l'immunità dei pazienti provocando la risoluzione dell'infezione cronica. Si osserva questo effetto in pazienti che presentano una sindrome post-virale e in altre infezioni virali croniche per esempio prostatite cronica provocata da virus e herpes ricorrente.

Inoltre, si è ora scoperto che si possono anche trattare pazienti infettati con HIV nei modi descritti sopra. Si possono migliorare gli ultimi

stadi dello stato carrier come da sindrome post-virale Coxsackie B4. Per questo scopo, si dovrà usare una formulazione desensibilizzante che contiene beta-glucuronidasi e 1,3-cicloesan diolo, con oppure senza allergeni. Quando è opportuno, si può collegare questo trattamento ad una terapia alimentare, ad una terapia anti-candida e a misure atte ad evitare allergeni. Come alternativa, si può migliorare qualsiasi fase dell'infezione HIV mediante somministrazione al paziente di una formulazione ipersensibilizzante di beta-glucuronidasi e di 1,3-cicloesan diolo.

ESEMPIO 1

Formulazioni adatte per il trattamento di un paziente con sindrome post-virale o infezione HIV, con caratteristiche che suggeriscono una ipersensibilità

Beta-glucuronidasi, 400 unità Fishman

1,3 cicloesan diolo, 3×10^{-10} g

Protamina 2×10^{-6} g

Antigeni 1×10^{-10} fino a 1×10^{-14} g (facoltativi)

Solfato di condroitina 0,1 mg

Iniezione per via intradermica in 0,2 ml di soluzione tampone acetato di sodio/HCl, pH 6,9.

ESEMPIO 2

Formulazioni adatte per fare aumentare la risposta
immune cellulare verso vaccini immunizzanti

Beta-glucuronidasi, 400 unità Fishman

1,3 cicloesan diolo, 3×10^{-8} g

Protamina 2×10^{-6} g

Una adatta dose di antigene

Iniezione per via intradermica in 0,2 ml di
soluzione tampone acetato di sodio/HCl, pH 6,9.

ESEMPIO 3

Formulazioni adatte per il trattamento di uno stato
"carrier" virale

Beta-glucuronidasi, 400 unità Fishman

1,3 cicloesan diolo, 3×10^{-8} g

Protamina 2×10^{-6} g

Iniezione per via intradermica in 0,1 ml di solu-
zione-tampone acetato di sodio/HCl, pH 6,9.

ESEMPIO 4

Trattamento di un paziente infettato dal Virus da
Immunodeficienza Umana

Il paziente è un uomo di 32 anni. Probabile
data dell'infezione: da 4 anni. Condizioni di sa-
lute non buone, non specifiche negli ultimi 10 mesi.
Diagnosi effettuata un anno prima del trattamento
con beta-glucuronidasi. Effettuati 3 trattamenti
secondo la formulazione dell'esempio 3 mediante

iniezioni intradermiche.

Le conte dei linfociti e le date del trattamento erano le seguenti:

(Valori normali di laboratorio)		1500-4000	815-2480	280-1350)
Data	Trattamento	Totale Linfociti	T4 (Protettore)	T8 (Soppressore)
23 Luglio	-	3306	661	2248
4 Agosto	Dose 1			
25 Agosto	-	3876	271	3458
17 Settembre	-	2989	209	2152
23 Settembre	Dose 2			
27 Ottobre	Dose 3			
3 Dicembre		5049	1009	3839

Interpretazione:

Il paziente aveva già numeri aumentati di linfociti T8. La prima dose di beta-glucuronidasi attivata ha stimolato le cellule T8, in particolare quelle aventi una funzione distruttiva. Le cellule del sottogruppo T4 che erano già infettate dal virus (e pertanto non funzionali) sono state eliminate.

Un ulteriore trattamento stimola la riproduzione

zione dei sottogruppi T4 e T8 con recupero dei numeri T4.

In Settembre, il paziente, che aveva riguadagnato il suo benessere, è stato colpito da un attacco di influenza dal quale esso si è ripreso rapidamente senza effettuare alcun trattamento oppure senza che si avesse alcuna complicazione. E' possibile che le cellule T8 siano state influenzate dalla beta-glucuronidasi in modo da adottare certe funzioni protettive.

La conta di linfociti T8 aumentati prima del trattamento è tipica di una contemporanea infezione da citomegalovirus (CMV). In corrispondenza della conclusione del trattamento, il test CMV - IgM era negativo. In corrispondenza di questo stadio, le elevate conte di linfociti T8 si manifestavano come risposte ai trattamenti con beta-glucuronidasi effettuati da soli.

RIVENDICAZIONI

1. Composizione per l'impiego nel trattamento di infezioni virali croniche nell'uomo che comprende beta-glucuronidasi, come ingrediente attivo, in un mezzo acquoso sterile.

2. Composizione secondo la rivendicazione 1 per l'impiego nell'alterare la risposta immune in

uomini che soffrono di encefalopatia mialgica oppure infetti da virus da immunodeficienza umana.

3. Composizione secondo la rivendicazione 1 oppure secondo la rivendicazione 2, nella quale la concentrazione di beta-glucuronidasi nel mezzo acquoso sterile è compresa tra 50 e 1000 unità Fishman per dose da somministrare ad un paziente.

4. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3 che comprende inoltre un diolo oppure un poliolo che contiene almeno due gruppi ossidrilici che sono situati su atomi di carbonio adiacenti o separati da fino a 4 atomi di carbonio nella molecola per controllare l'attività immunologica della beta-glucuronidasi.

5. Composizione secondo la rivendicazione 4, nella quale il diolo è 1,3-cicloesano diolo.

6. Composizione secondo la rivendicazione 5, nella quale il 1,3-cicloesano diolo è presente ad una concentrazione compresa tra 3×10^{-10} e 1×10^{-11} g per dose da somministrare ad un paziente.

7. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6, nella quale la composizione comprende inoltre un composto di una diammina oppure un composto di una poliammina.

8. Composizione secondo la rivendicazione 7,

nella quale il composto di una poliammina è protamina.

9. Composizione secondo la rivendicazione 8, nella quale la protamina è presente ad una concentrazione compresa tra 1×10^{-8} e 1000×10^{-8} g per dose da somministrare ad un paziente.

10. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9 che comprende inoltre una sostanza-tampone priva di fosfato.

11. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 10 che comprende inoltre una minore quantità di un allergene oppure di un suo estratto.

12. Composizione secondo la rivendicazione 11, che comprende inoltre 6-solfato di condroitina come sostanza-veicolo per l'allergene oppure per l'estratto di allergene.

13. Composizione per l'impiego nel fare aumentare la risposta immune cellulare nell'uomo che comprende una soluzione-tampone priva di fosfato, acquosa, sterile di 50 fino a 1000 unità Fishman di beta-glucuronidasi, 1×10^{-8} fino a 1×10^{-7} g di 1,3-cicloesano diolo, 1×10^{-8} fino a 1×10^{-5} g di protamina e una adatta dose di un antigene, tutte le concentrazioni essendo espresse per dose da som-

ministrare ad un paziente.

14. Una composizione per stimolare la risposta immune in uomini che soffrono di infezioni virali croniche che comprende una soluzione-tampone priva di fosfato, acquosa, sterile di 50 fino a 1000 unità Fishman di beta-glucuronidasi, 1×10^{-8} fino a 1×10^{-7} g di 1,3-cicloesano diolo e 1×10^{-8} fino a 1×10^{-5} g di protamina, tutte le concentrazioni essendo per dose da somministrare ad un paziente.

1 MANDATARIO

(firma)

Tab: L. i. m. e.

(per sé e per gli altri)

